

論文内容の要旨

申請者氏名 鳥居英人

論文題目

Regulatory Mechanism of The 2,4,6-Trichlorophenol Catabolic Operon in *Ralstonia pickettii* DTP0602

これまでの人類の産業活動によって、様々な化合物が生産・放出されてきた。これらの化合物の中には、生物に対して毒性を示し難分解性のため土壌に残留する汚染物質が含まれている。そこで、これらの汚染物質を分解する生物を利用した環境浄化技術が研究されている。しかし、汚染物質の分解酵素は環境中で効率的に働かず、実用化には至っていない。本研究では、DTP0602株の2,4,6-トリクロロフェノール(2,4,6-TCP)分解酵素遺伝子群の転写制御機構に着目した。人為起源物質である2,4,6-TCPは、殺菌剤、殺虫剤、木材の防腐剤として世界中で使用され、環境中に残留しているフェノール化合物である。*Ralstonia pickettii* DTP0602株は2,4,6-TCPを単一の炭素源として生育可能であり、2,4,6-TCP分解機構が解析されてきた土壌細菌である。DTP0602株は、2,4,6-TCPをHad酵素群(HadA, B, C, D)によって3-オキソアジピン酸へと変換した後にTCA回路で代謝しており、2,4,6-TCP分解酵素遺伝子群は*hadX-C*オペロンを形成していた。

そこで、本論文では環境中の2,4,6-TCPの効率的な除去へDTP0602株を応用することを目的に、*hadX-C*オペロンの転写制御機構を解析し報告した。第1章では、*hadX-C*オペロンの直上流に位置していたLysR型転写制御タンパク質(LysR Type Transcriptional Regulator; LTTR)と相同性を示すHadRの解析を行い、第2章では、HadR以外に*hadX-C*オペロンの転写制御を行う2成分制御系*hadPQ*の単離と解析を行った。

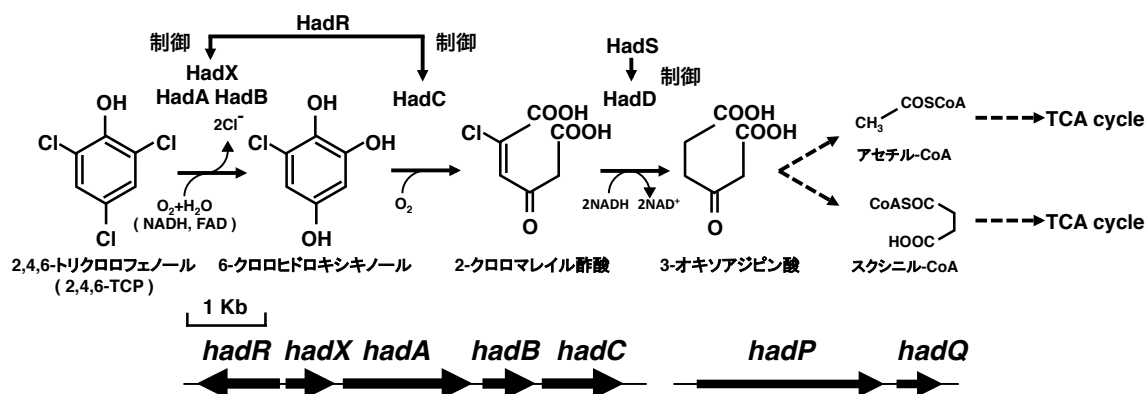


Fig1. DTP0602 株の 2,4,6-TCP 分解経路と分解酵素遺伝子群

最初に、*hadX-C* オペロンの転写制御機構の解析を行う上で、*hadX-C* オペロンの転写開始点とプロモーター配列を決定した。決定した *hadR*, *hadX* の転写開始点の上流には σ^{70} プロモーターに特有な -10, -35Box の配列が存在していたことから、*hadX* プロモーターが *hadX-C* オペロンの発現を制御していると示された。

2,4,6-TCP の生育能を調べたところ、*hadR* 遺伝子破壊株は 2,4,6-TCP 生育能を欠損していたため、HadR は 2,4,6-TCP の代謝に必須であることが示された。そこで、大腸菌内で HadR タンパク質を高発現させ、可溶性画分から 4 量体の精製 HadR を得た。HadR の結合領域を決定するために、精製 HadR を用いて結合試験を行った。HadR は *hadX* プロモーター上流領域に結合し、2,4,6-TCP 存在下でその結合能が増大することがわかった。さらに、DNase I footprinting 解析によって HadR 保護配列を決定したところ、HadR の保護配列は自身の N 末端を含む約 60 bp の領域であり、同領域内には LTTR の結合コンセンサス配列である T-N₁₁-A 配列

(ATNCCNCNGNGGNAT) が含まれていた。これらの結果から、HadR は 2,4,6-TCP を補因子として *hadX* プロモーター上流領域に結合することが示され、*hadX-C* オペロンの転写を制御していることが示された。

次に、HadR が結合領域に結合する際に認識することのできる補因子について検討した。置換基や位置が異なる各種置換フェノールを HadR の補因子として、結合試験を行なった。その結果、HadR は 2,4,6-TCP を含む 16 種類の置換フェノールを認識することができると示された。そこで、HadR の各補因子との親和性を解離定数によって評価した。その結果、それぞれの置換フェノールに対して異なる親和性を示しており、主な認識化合物と考えられてきた 2,4,6-TCP よりも 2,4,6-TBP の方が解離定数は小さかった。さらに、各置換フェノールによる HadR 保護領域を確認したが、HadR の保護配列は置換フェノールの種類によって変化しなかった。

これまでに、LTTR を含む様々な転写制御因子は、補因子の有無によって結合領域の湾曲角度を変化させることが報告されている。そこで、HadR による結合領域の湾曲角度を測定した。その結果、HadR は補因子の種類によっても湾曲角度を変化させないことが示された。これまでに、湾曲角度を変化させない LTTR として MetR と TrpI が報告されているが、これら 2 種類の結合領域は HadR の保護領域と異なっていた。以上のことから、湾曲角度を含む HadR の結合特性には新規性が認められた。

最後に、16 種類の置換フェノール存在下での *hadX-C* オペロンの転写活性化能を測定した。その結果、*hadX-C* オペロンの転写は 7 つの化合物によって特異的に誘導され、その他の HadR が認識することのできる置換フェノールによっては誘導されなかった。よって、HadR の認識する補因子と *hadX-C* オペロンの転写を誘導する補因子の種類には相違点があると示された。

以上のことから、*hadX-C* オペロンの転写活性化は 2,4,6-TCP を含む 16 種類の置換フェノールを認識することができると示され、HadR によって制御されており、HadR の保護領域と湾曲角度は各補因子存在下で変化しない特徴をもつ制御系であることが示された。さらに、HadR が認識できる補

因子と *hadX-C* オペロンの転写を誘導できる補因子が一致しないという特徴も有していることが示された。

第二章では、*hadX-C* オペロンの転写活性化に関わる *hadPQ* 遺伝子の単離と解析を行った。*Acidovorax* sp. KKS102 株のビフェニル分解酵素遺伝子群は、GntR 型転写制御因子 BphS と 2 成分制御系 BphP, BphQ によつての転写制御されることが報告されている。さらに、*Ralstonia* 属細菌が含まれる β -プロテオバクテリアには、BphQ の相同遺伝子が広く保存されていることも報告されている。そこで、DTP0602 株においても BphP, BphQ の相同遺伝子が存在していると考え、BphP, BphQ 相同遺伝子の単離と機能解析を行った。

最初に、BphP, BphQ のアミノ酸配列を元に DTP0602 株のドラフトゲノム内を検索したところ、BphP と 43%, BphQ と 64%の相同性を示す ORF が 1 つずつ存在していたため、これらの遺伝子を *hadP*, *hadQ* と名付けた。HadP, HadQ のアミノ酸には 2 成分制御系に特徴的なドメインが保存されており、HadP をセンサーキナーゼ、HadQ をレスポンスレギュレーターと考えた。*hadP*, *hadQ*, *hadPQ* 遺伝子破壊株を作成し、2,4,6-TCP の脱塩素活性を測定した。その結果、全ての破壊株において、2,4,6-TCP 脱塩素反応由来の遊離塩素は測定されなかった。よつて、*hadP*, *hadQ* 遺伝子は、2,4,6-TCP の脱塩素反応に関与していることが示された。2,4,6-TCP 脱塩素酵素である HadA は、*hadX-C* オペロンに含まれている。よつて、これらの表現系は *hadX-C* オペロンの転写活性化の低下に起因するものと考えられたため、各遺伝子破壊株における *hadX-C* オペロンの転写活性化能を調べた。その結果、2,4,6-TCP による *hadX-C* オペロンの転写活性化は、誘導されていなかった。

次に、HadP のアミノ酸配列を元に相同性を検索したところ、HadP は *Rhodobacter capsulatus* の 2 成分制御系のセンサーキナーゼである DctS と 35%の相同性を示すことが明らかになった。一方、クエン酸と C_4 -ジカルボン酸を認識する TctE や CitA などのセンサーキナーゼとは有意な相同性を示さなかった。これまでに、DctS は、コハク酸、リンゴ酸、フマル酸などの C_4 -ジカルボン酸の代謝に必須であることが示されている。よつて、HadP も DTP0602 株の C_4 -ジカルボン酸の代謝に関係していると予想され、*hadPQ* 遺伝子破壊株を用いて C_4 -ジカルボン酸を単一の炭素源として加えた培地上での生育能を調べた。その結果、*hadPQ* 遺伝子破壊株はコハク酸、リンゴ酸、フマル酸などの C_4 -ジカルボン酸上では野生株と同様に生育できたが、クエン酸では生育することができなかった。よつて、*hadPQ* 遺伝子は、 C_4 -ジカルボン酸の代謝には関与せず、クエン酸の代謝に関与している事が示された。

以上の結果、HadR 以外にも HadPQ が *hadX-C* オペロンの転写活性化には関与していることが明らかになった。さらに、HadP は C_4 -ジカルボン酸の代謝には関与せずに、クエン酸の代謝に関係していた。よつて、TCA サイクルのクエン酸代謝に関わる遺伝子が、2,4,6-TCP 分解酵素遺伝子群の転写活性化と脱塩素に関与していることが明らかになった。

本研究の結果から、これまでに解明されていなかった DTP0602 株の 2,4,6-TCP 分解酵素遺伝

子群の転写活性化機構が明らかになった。DTP0602 株の 2,4,6-TCP 分解酵素遺伝子群の転写活性には、LTTR と 2 成分制御系の転写制御因子が必須であることが示された。さらに、HadPQ がクエン酸の代謝にも必須であったことから、DTP0602 株の 2,4,6-TCP 分解経路の制御はクエン酸回路の中央代謝経路の制御とも関係していることが明らかになった。本研究の結果は、これまでの芳香族化合物の代謝経路に新しい知見を与えており、DTP0602 株を用いた 2,4,6-TCP 汚染土壌浄化法など微生物を用いた環境浄化法の開発・発展に寄与するものであると考えられる。

(学術論文) 査読あり

1. H. Torii, A. Machida, H. Hara, T. Hatta and N. Takizawa, 2013, Microbiology, The Regulatory Mechanism of 2,4,6-Trichlorophenol Catabolic Operon Expression by HadR in *Ralstonia pickettii* DTP0602. 159. 665-77

(国際会議における発表) 査読あり

1. H. Torii, H. Hara, H. Yabe, N. Takizawa, and T. Hatta (2010) A Unique Transcriptional Regulator HadR Involved in 2,4,6-Trichlorophenol Degradation in *Ralstonia pickettii* DTP0602, 14th International Biotechnology Symposium and Exhibition, Rimini, Italy, September 2010.

(国内学会における発表)

1. 八田 貴、鳥居英人、原啓文、滝沢昇、クロロフェノール分解菌 *Ralstonia pickettii* の分解及び誘導基質特異性、環境バイオテクノロジー学会 2009 年度大会、東京、2009 年 6 月
2. 鳥居英人、原啓文、滝沢昇、八田 貴、土壌細菌 *Ralstonia pickettii* の 2,4,6-TCP 分解遺伝子を制御する *hadR* の解析、日本農芸化学会 2010 年度大会、東京、2010 年 3 月
3. 鳥居英人、矢部博敬、原啓文、滝沢昇、八田貴、*Ralstonia pickettii* のフェノール類分解遺伝子転写活性化基質の特異性、第 33 回日本分子生物学会年会、神戸、2010 年 12 月
4. 鳥居英人、原啓文、矢部博敬、滝沢昇、八田貴、*Ralstonia pickettii* DTP0602 株の 2,4,6-TCP 分解遺伝子群における異化抑制機構の解析、日本農芸化学会 2011 年大会、京都、2011 年 3 月
5. 鳥居英人、矢部博敬、八田貴、原啓文、滝沢昇、ラルストニア属細菌における異化抑制機構の解析、農芸化学会中四国支部創立 10 周年記念第 30 回講演会、2011 年 5 月
6. 鳥居英人、矢部博敬、八田貴、原啓文、滝沢昇、*Ralstonia pickettii* DTP0602 株における 2,4,6-トリクロロフェノール分解酵素遺伝子群の転写制御機構の解析、日本農芸化学会 2012 年大会、京都、2012 年 3 月
7. 鳥居英人、矢部博敬、八田貴、原啓文、滝沢昇、*Ralstonia* 属細菌における 2,4,6-トリクロロフェノール分解酵素遺伝子群の転写制御機構の解明、生物工学会西日本支部創立 30 周年記念講演会、岡山、2012 年 7 月